

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-071566

(43)Date of publication of application : 08.03.2002

(51)Int.Cl.

G01N 21/64

G01N 21/01

G01N 21/03

(21)Application number : 2000-254500

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 24.08.2000

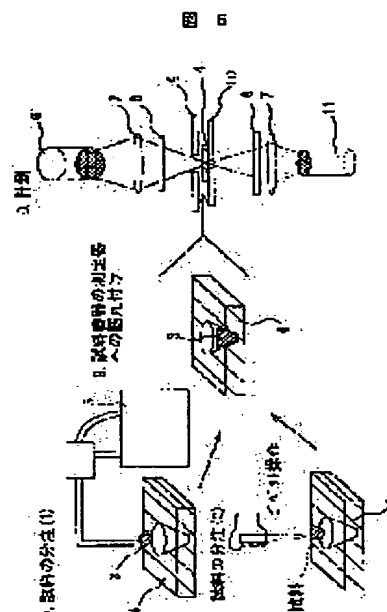
(72)Inventor : SAITO MITSUHIRO
YASUDA KAZUO

(54) FLUORESCENCE OR PHOSPHORESCENCE MEASURING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a sample holder which uses the surface tension of a liquid sample and which can perform an analytical measurement without placing a holder material in the passage direction of excitation light or measuring light emitted from the sample, and to provide a high-sensitivity fluorescence or phosphorescence measuring method which uses the sample holder.

SOLUTION: In the fluorescence or phosphorescence measuring method, the liquid sample is held in a sample holding part by the surface tension of the liquid sample, only the sample is interposed with reference to the irradiation direction of the excitation light, and fluorescence or phosphorescence is measured without detecting nonspecific fluorescence, phosphorescence or light scattering resulted from the material of the sample holder. The sample holder can perform the measuring method.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 31.10.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 13.04.2004

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-71566

(P2002-71566A)

(43) 公開日 平成14年3月8日(2002.3.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N	21/64	G 0 1 N	Z 2 G 0 4 3
	21/01		B 2 G 0 5 7
	21/03		Z 2 G 0 5 9

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2000-254500(P2000-254500)

(22) 出願日 平成12年8月24日(2000.8.24)

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 斎藤 充弘

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株

式会社日立製作所計測器グループ内

(72) 発明者 保田 和雄

茨城県ひたちなか市大字市毛1202番地

(74) 代理人 100074631

弁理士 高田 幸彦 (外1名)

最終頁に続く

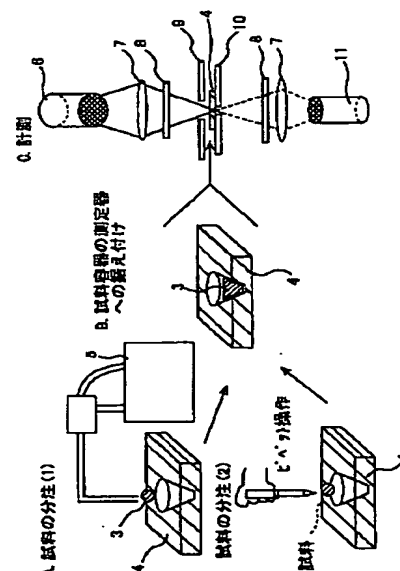
(54) 【発明の名称】 蛍光、燐光測定方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、液体試料の表面張力を利用し、励起光あるいは試料の発光の測定光通過方向にホルダー材料を置かずに分析測定を可能とする試料ホルダー及びそれを用いた高感度の蛍光・燐光分析測定方法を提供する。

【解決手段】 液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光あるいは光散乱を検出することなく蛍光又は燐光を測定する蛍光、燐光測定方法及びそれを可能とする試料ホルダー。

図 5



【特許請求の範囲】

【請求項1】液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する蛍光、燐光又は光散乱の検出を抑えたことを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項2】請求項1において、試料保持部の材料がカーボン材、グラシックカーボン、タングステンカーボン又はパイロコートドカーボンの中のいずれかを含み、且つ前記試料保持部の材料が励起光により形成された逆錐形の穴を有し、該穴の底部の面積が0.01～5mm²であって、前記穴内に試料が表面張力で保持されていることを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項3】請求項2において、逆錐形の穴が逆円錐形、逆三角形又は逆四角形であって、該逆錐形の穴の底部から液体試料が漏れることのない表面張力を有し、該表面張力によって試料保持部の穴内に試料が保持されていることを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項4】液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光又は光散乱を検出することなく、前記試料保持部の材料を柱状にし、左右又は上下に0.2～3mmの間隔を置いて保持し、前記試料保持部の穴内に試料が表面張力で保持されていることを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項5】透過面蛍光測定方式又は透過面燐光測定方式を用いた蛍光、燐光測定方法において、分析対象試料以外に由来する蛍光又は燐光の検出精度が分析精度に影響を及ぼさない範囲とする試料保持部を用いたことを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項6】試料を試料保持部に表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させた試料保持部であって、該試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光又は光散乱の検出精度が分析精度に影響を及ぼさない範囲であることを特徴とする試料保持部。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は蛍光測定装置又は燐光測定装置における試料の蛍光、燐光測定方法及びそれに用いる試料保持部（試料ホルダー）に関する。

【0002】

【従来の技術】蛍光測定装置、燐光測定装置、又は化学発光法を適用した発光測定装置においては、測定時に試料を固定、保持するための試料ホルダーは石英等の透明な鉱石、透明な人工石、あるいはポリカーボネート材、ポリビニル材等が用いられている。

【0003】これらの試料ホルダーは試料を確実に保持し、一部、ディスプレイに使用でき測定を容易にす

る。

【0004】しかし、これらに用いる材料はそれに由来する発光、蛍光、燐光が発生し、試料から発する光と同時に検出されるために測定精度の向上を阻害する。例えば市販の96穴マイクロプレートにおいては、試料を含まない場合でも数穴で光の測定値が著しく高いことがある。このことは、試料中に測定対象物が含まれていないにもかかわらず、あたかも試料中に測定対象物があるかのように分析測定が為される可能性のあることを示している。

【0005】また、同一材料のセル又はプレートを用いても光の強度にバラツキがあり、適用した分析測定法あるいは測定装置の最小検出限界（分析精度）を著しく低下させる。同様に、全く同一のセルあるいはプレートを繰り返して用いた場合も、この種の光の発光があり、同様の問題が生じる。

【0006】従来、この試料ホルダー又は容器の材料に由来する光を低減させる目的で、予め蛍光分析等を行い干渉光の小さい材料を選択して用いる、材料を薄くする、材料表面に干渉光を遮蔽するコーティングをする、等の処置を行ってきた。しかし、いずれの方法も干渉光を十分に低減又は遮蔽すること難しい。

【0007】試料ホルダーの材料に由来する干渉光の測定への影響を回避する目的で、側面蛍光測定方式又は照射面蛍光測定方式が提案されている。しかし、これらの方式は励起光の光量又は蛍光の光量を多く取り出すために光束の立体角を大きくする必要があり、このため測定装置の作製が難しく、高いコストとなる。また、照射面測光方式では励起光を放射するランプと試料を結ぶ直線の極短い延長線上に試料ホルダーの材料があり、これに由来する干渉光は分析の高精度化を阻害する。

【0008】蛍光測定装置、燐光測定装置、化学発光法等を適用した発光測定装置及びこれらを適用した自動分析装置を用いて、微量測定対象物が含まれる試料を分析する場合、この干渉光は試料の測定の障害となる。また、干渉光の存在は、本来の装置の能力を低下させ、特に試料中の微量な重要物質の分析検出を妨げる。

【0009】上記の従来方法は、試料ホルダーの材料として干渉光の放射が小さい材料を単独又は組み合わせる、非特異光を大きくすることになる加工工程を削減する、非特異光を発する物質を混合しない、表面に干渉光の遮蔽処理を行う、ことである。

【0010】例えば96穴マイクロプレートの試料ホルダーを水平に置き上部に保持材料を使用せず、試料ホルダーの底面と側面のみで試料を保持し、上部からの励起光照射、上部又は底部からの測光に対し、光の通過するホルダー材料面を1面とする手法が用いられている。更に、液体試料を蛍光又は燐光の測光する方式を、透過面測光方式又は側面蛍光方式ではなく、ホルダー材料面を測光が通過することのないよう照射面測光を採ることの

開示がある。

【0011】いずれの手法も試料ホルダーは非特異光を発する材料を使用し、ホルダー材料が励起光又は試料の発光の測定光通過方向にあり、十分に干渉光を取り除く機能を備えていない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、液体試料の表面張力を利用し、励起光あるいは試料の発光の測定光通過方向にホルダー材料を置かずに分析測定を可能とする試料保持ホルダーを用いて、試料中の測定対象物の最小検出限界が高感度の蛍光・燐光分析測定方法を提供する。

【0013】また、試料保持ホルダーにカーボン材等の放射光が小さい材料を用いて作製し、試料の高感度分析測定を行うものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】上記課題を達成する本発明の要旨は以下のとおりである。

【0015】液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光あるいは光散乱を検出することなく蛍光又は燐光を測定する蛍光、燐光測定方法である。

【0016】そして、前記の試料保持部の材料がカーボン材、グラシックカーボン、タングステンカーボンまたはパイロコートカーボンの中のいずれかを含み、且つ前記試料保持部の材料が励起光により形成された逆錐形の穴を有し、該穴の底部の面積が $0.01 \sim 5 \text{ mm}^2$ であって、前記穴内に試料が表面張力で保持されていることが好ましい。更に、前記の逆錐形の穴が逆円錐形、逆三角形又は逆四角形であって、該逆錐形の穴の底部から液体試料が漏れることのない表面張力を有し、該表面張力によって試料保持部の穴内に試料が保持されていることが好ましい。

【0017】また、液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光あるいは光散乱を検出することなく、前記試料保持部の材料を柱状にし、左右又は上下に $0.2 \sim 3 \text{ mm}$ の間隔を置いて保持し、前記試料保持部の穴内に試料が表面張力で保持されていることを特徴とする蛍光、燐光測定方法である。

【0018】また、透過面蛍光測定方式又は透過面燐光測定方式を用いた蛍光、燐光測定方法において、分析対象試料以外に由来する非特異的な蛍光又は燐光の検出精度が分析精度に影響を及ぼさない範囲とする試料保持部、試料を試料保持部に表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させた試料保持部であって、該試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光又は光散乱の検出精度が分析精度に影響を

及ぼさない範囲とする試料保持部である。

【0019】本発明において、蛍光測定装置又は燐光測定装置では試料保持部に試料を固定して分析する。この時、励起光あるいは測定光の方向には試料以外の物を介在させず、試料以外の物に由来する干渉光に影響されることなく、蛍光、燐光を測定する。

【0020】液体試料はその表面張力により試料保持部（試料ホルダー）に保持され、ランプからの励起光照射を受け試料に由来する蛍光、燐光等の発光を検出、分析される。本発明においては、前記試料ホルダーの材料が試料以外に由来する測定干渉光（蛍光又は燐光）を検出、測定することが極めて小さいことに特徴がある。

【0021】試料は透過面測光方式、照射面測光方式を用いて分析されるが、励起光光軸、測定光光軸は試料ホルダー材料の面を通過しない。たとえ試料ホルダーの壁面を励起光が照射しても、試料ホルダーの材料が非蛍光、燐光性であれば問題はなく、散乱光による干渉のみに影響を受ける程度に納まる。散乱光による干渉は時間分解測定で取り除くことができる。

【0022】

【発明の実施の形態】以下、図1～図4により本発明を詳細に説明する。

【0023】

【実施例1】図1は蛍光測定装置に用いる試料ホルダーの概略図である。カーボン材プレート1に逆円錐形の穴を上部より開け、底部は極小径の穴を開ける。底部の穴の直径Rは $0.5 \sim 3 \text{ mm}$ が好ましい。この円錐形の穴に液体試料 $2 \mu\text{l}$ （マイクロリットル） $\sim 200 \mu\text{l}$ を滴下し、蛍光測定装置を用いて分析測定する。カーボン材は液を通し難いガラス化炭素又はタングステンカーボン、パイロコートされたものが好ましい。底部の穴の径Rは多量の試料が保持できるように可能な限り大きくしたほうがよい。Rは液体試料の粘性、試料中微小粒子、凝集塊の有無、界面活性剤の有無等により特定される表面張力により保持される試料の量と関係する。この場合の測定は透過面測光方式又は照射面測光方式を用いる。

【0024】穴の形状は三角、四角などの逆錐形とすることもでき、底部の穴の面積は $0.01 \sim 5 \text{ mm}^2$ が好ましい。底部のカーボン材の厚さが薄いほうが望ましいのであるが、脆弱であってはならず、 $0.3 \sim 2 \text{ mm}$ 程度が好ましい。逆錐形上部の円の直径又は三角、四角の面積は底部穴の大きさにもよるのであるが $1 \sim 100 \text{ mm}^2$ 、より好ましくは $1 \sim 10 \text{ mm}^2$ であり、試料台の高さは、 $2 \sim 15 \text{ mm}$ が好ましい。

【0025】

【実施例2】図2は蛍光測定装置に用いる別の試料ホルダーの概略図である。

【0026】カーボン材プレート1に上部を大径の円柱、下部を小径の円柱として、試料を多量に保持できる

円柱状の穴を開けた例である。直径は0.5～3mmが好ましい。この円柱形の穴に液体試料5～200 μ lを滴下し、蛍光測定装置にて分析測定する。この場合の測定は透過面測光方式又は照射面測光方式を用いる。

【0027】底部の穴の面積は0.01～5mm²が好ましい。底部のカーボン材の厚さが薄いほうが望ましいのであるが、脆弱であってはならず、0.3～2mm程度が好ましい。逆錐形上部の円の直径又は三角、四角の面積は底部穴の大きさにもよるのであるが1～100mm²、より好ましくは1～10mmであり、試料台の高さは、2～15mmが好ましい。

【0028】

【実施例3】図3は蛍光測定装置に用いる他の試料ホルダーの概略図である。

【0029】カーボン材プレート1に円柱状の穴を開ける。この穴が底部に達し穴を貫通させることはない。この穴の大きさは任意であるが、市販の96穴マイクロプレートでは上部は6.5mm程度の直径の円形である。底部のカーボン材の厚さが薄いほうが望ましいのであるが、脆弱であってはならず、0.3～2mm程度が好ましい。この場合の測定は照射面測光方式を用いる。

【0030】

【実施例4】図4に示すごとく、カーボン材円管あるいは角管を2本作製し、左右あるいは上下に小さい間隔を置いて保持する。間隔は、0.5～4mm程度が適当である。この間隔に試料2～200 μ lを滴下し、測定装置にて分析測定する。角管の試料面での大きさは任意で良いが、0.5mm³～100立方mm³が好ましい。

【0031】次に図5及び図6を用いて本発明の蛍光、燐光測定方法を詳細に説明する。

【0032】

【実施例5】図5に示すごとく、試料3は試料自動分注装置（図中、A. 試料の分注（1）に示す）又は人為的にピペットを用いて（図中、A. 試料の分注（2）に示す）試料ホルダー穴に分注する。試料3の量は2～200 μ lが好ましく、穴周囲に漏らすことは望ましくない。ホルダー下部（底面）には0.01～5mm²穴があるが、試料3は表面張力にてホルダー4内に保持される（図中、B. 試料容器の測定器への据え付け）。試料3が少量である場合、不均一に穴内にあると測定時の変動が大きくなるため、軽くホルダー4を振動させて、試料3を均一に充填させる。また、試料3が大量にある場合も試料3の表面張力により試料表面が不均一となるから、試料3のホルダー4への分注後、ホルダー4を軽く振とうして表面を滑らかとする。

【0033】ホルダー4は汚染を受けず無用な干渉光又は散乱光を発生させないためにも、照射光の照射を受ける部位である上面又は下面を直接手で触れずに保持、移動させることが好ましい。ホルダー4底部穴の中心が照射光の中心部に位置することが好ましい。ホルダー台に

はガイドを付けホルダーが定められた位置にうまく収まることが好ましく、ホルダー4がずれた位置にある場合、精度の高い計測が行われない場合がある。

【0034】ホルダーをホルダー台10に置く。装置に入ったホルダー4は測定部照射光にされる部位にセットされ、測定が開始される（図中、C. 計測に示す）。

【0035】

【実施例6】図6～図9は前記ホルダー4を用いる光学系装置の構成の概略を示した。

【0036】該光学系装置は透過面測光方式（側面測光方式：図6、図7、照射面測光方式：図8、図9）で測定でき、ホルダー台10の所定位置にホルダー4をセットする。光源6より発せられた励起光は、レンズ7にて集光される。色ガラスフィルター8を通り波長の選択がなされる。光源はキセノンランプ、タングステンランプ、レーザー等を用いる。その後、シャッター9を通過した励起光は試料3に照射される。このときの照射光の立体角及び光源6、レンズ7から試料3までの距離は試料3及び試料ホルダー4のサイズに合ったものであることが好ましい。

【0037】試料ホルダー材料への励起光の直接照射は散乱光あるいは余分な干渉光を生むことになる。この為、試料3への照射光は平行光として、試料3の照射部面積に相当する大きさ又はそれ以下とするか、照射光が試料中あるいは試料の近辺で焦点を結ぶ場合、ホルダー4の開口部の大きさと光束の大きさとが同等か光束の大きさが若干小さいことが好ましい。

【0038】透過面測光方式を用い照射光が平行光でない場合、図1、図2の試料ホルダー4においては底部穴の中心を照射光の焦点とすることが好ましい。

【0039】この場合、図6に示すように、光源6を下部に、測光器11を上部に置き、測光器容器ホルダー9及び10の下部より照射光を照射し、上部より測光器11を用いて測光を行うことは照射光による蛍光、燐光が方向指向性無くす個とができることから、より強い測光検出が為されることもある。同様に、図3においては照射面測光方式を採用することができる。

【0040】これら照射面測光方式をとる場合、図1、図2、図3のホルダー4において試料3の底部を焦点とすることが好ましい。この場合、ホルダー4の側面にもカーボン材が用いられている場合、励起光、発光ともにカーボン材を横断して進行することはない。

【0041】本実施例において、より良好に照射及び集光を行うためにダイクロイックフィルター、スプリットミラー、半透過ミラー、平面鏡、凹面鏡、光ファイバーを用いることができる。

【0042】蛍光又は燐光測定手法においては、蛍光又は燐光の波長は励起光の波長と異なることが好ましく、励起光は試料に適した波長とし、蛍光あるいは燐光の波長に同じか隣接した波長のものとしなないため、あるいは

散乱光を遮断するため色ガラスフィルターおよび干渉フィルターを単独あるいは組み合わせて用いることが好ましい。

【0043】前記のフィルター又はミラーは紫外線によって蛍光を放射し、この光が散乱されて測光器に導入され検知される場合がある。このような光が問題になる場合には干渉フィルターや色ガラスフィルターを蛍光の放射の小さいものを選択すると共に、これらの組み合わせを工夫し試料に由来するものではない蛍光を充分小さく調整する。

【0044】図1、図2及び図3のホルダー4においてはホルダー側面がカーボン材であれば側面測光方式を採用することはなく、透過面測光方式か、照射面測光方式が用いられる。

【0045】図4のホルダー4においては、透過面測光方式、照射面測光方式、側面測光方式のいずれも適用される。透過光の焦点は試料の中心又は周辺部、間隙の中心あるいは周辺部のいずれかに設け、試料の効果的な蛍光発光、燐光発光がなされ、かつ、散乱光の極力減少されるようにすることが好ましい。更に試料3中での励起光の屈折率をも考慮されていることが好ましい。

【0046】上記のいずれの方法においても、試料3に由来する蛍光、燐光を充分効率よく測光するには、光源、レンズ、あるいは試料ホルダー等、試料3に由来するものではない蛍光、燐光の測光を十分に小さく出来るものでなければならない。

【0047】光源がレーザー光の場合、光束の大きさ又は照射光の中心は試料あるいは測定のために合ったものとする必要があるが、ランプを用いればより容易に設定できる。

【0048】測光器11としては光電子倍增管、CCDカメラ、フォトダイオードなどが用いられる。試料3より発せられた蛍光又は燐光を効率よく測光器11に集光するため、レンズあるいはミラーが用いられる。

【0049】また、蛍光又は燐光の波長は励起光の波長と異なることが一般的であることから、励起光あるいは散乱光を遮断し蛍光又は燐光を通過させる色ガラスフィルターおよび干渉フィルターを単独あるいは組み合わせて用いることもある。

【0050】測光器11より得られた計測値は、測光器11に付属した表示装置の画面に表示されるか、接続したコンピューターに取り込まれ記憶される。

【0051】図7に透過面測定方式の模式図を示した。図7においては、励起光の光路に反射ミラー12を置き励起光を屈折させた。同様に、測光器側にミラーを置

き、蛍光又は燐光を屈折させることもできる。

【0052】図8、図9に照射面測光方式の模式図を示した。

【0053】図8においては、ダイクロイックフィルター13を置き、励起光は屈折させるが、蛍光又は燐光は通過させた。凹面鏡15は、蛍光又は燐光の屈折を測光器11への集光のために用いた。平面鏡あるいはレンズ7を用いて、又は光ファイバーで行うこともできる。

【0054】図9においては、蛍光又は燐光の通過部位にミラーのないスプリットミラー14を用いて励起光を試料3に照射した。蛍光又は燐光の通路に励起光の当たるものを置かず、励起光による干渉光あるいは散乱光の測光器11への侵入を妨げるか、小さくする為である。蛍光又は燐光をスプリットミラー14により屈折させ、励起光をスプリットミラー14の間隙より照射しても良い。

【0055】

【発明の効果】本発明は、液体試料の表面張力を利用し、励起光あるいは試料の発光の測定光通過方向にホルダー材料を置かずに分析測定を可能とする試料保持ホルダーを用いて、試料中の測定対象物の最小検出限界が高感度の蛍光・燐光分析測定方法を提供できる。

【0056】また、試料ホルダーにカーボン材等の放射光が小さい材料を用いて作製し、試料の高感度で高効率の分析測定ができる試料ホルダーを提供する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の蛍光測定装置に用いる試料ホルダーの概略図である。

【図2】 本発明の別の蛍光測定装置に用いる試料ホルダーの概略図である。

【図3】 本発明の他の蛍光測定装置に用いる試料ホルダーの概略図である。

【図4】 本発明の透過面測光方式、照射面測光方式、側面測光方式に適用される試料ホルダーの概略図である。

【図5】 本発明の蛍光、燐光測定方法のプロセスの一例を示す。

【図6】 透過面測光方式（側面測光）の光学系装置の構成概略図である。

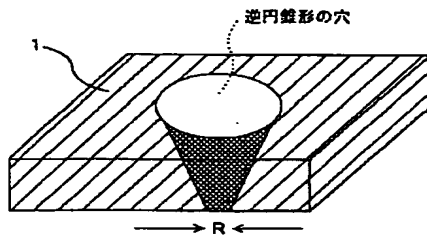
【図7】 別の透過面測光方式（側面測光）の光学系装置の構成概略図である。

【図8】 透過面測光方式（照射面測光）の光学系装置の構成概略図である。

【図9】 別の透過面測光方式（照射面測光）の光学系装置の構成概略図である。

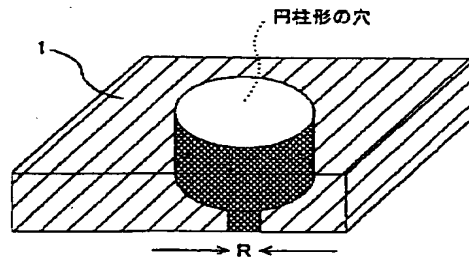
【図1】

図 1



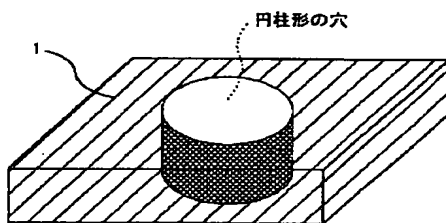
【図2】

図 2



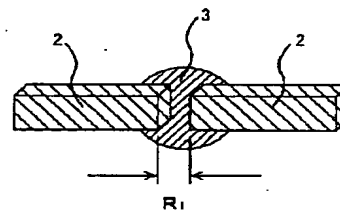
【図3】

図 3

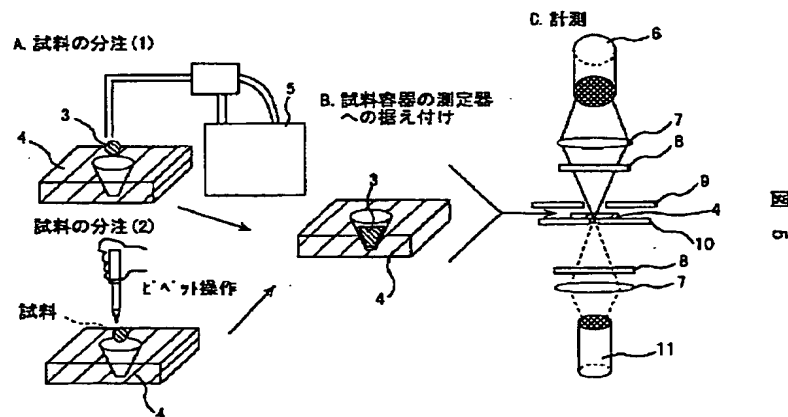


【図4】

図 4

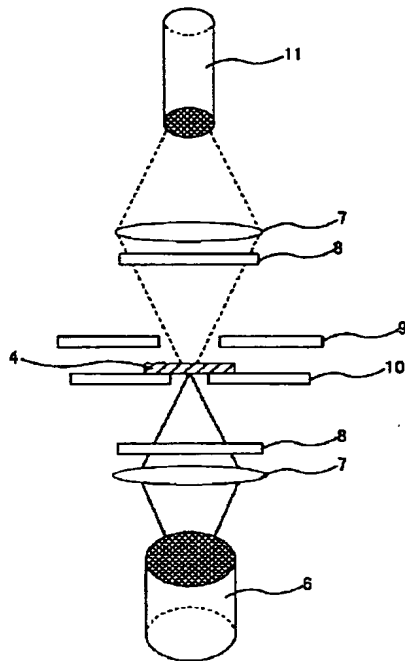


【図5】



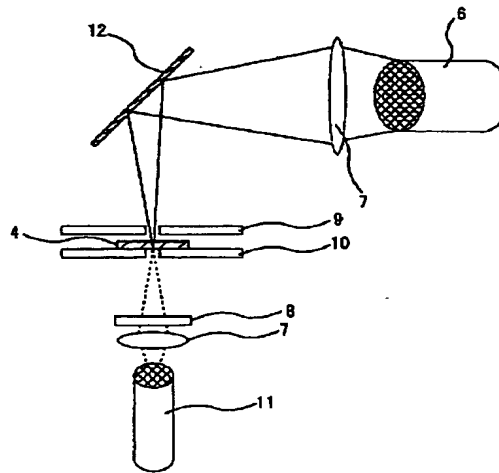
【図6】

図 6



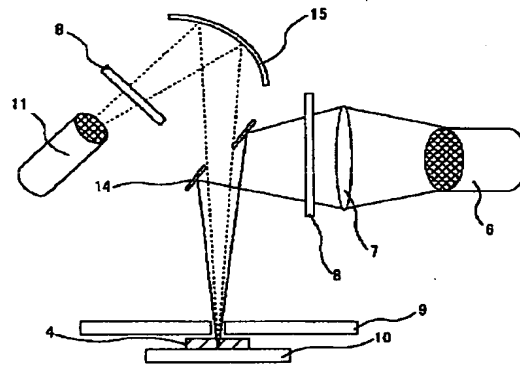
【図7】

図 7



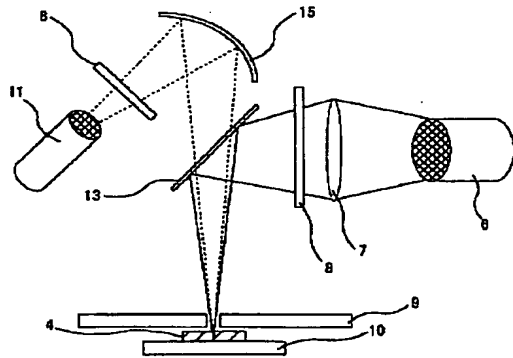
【図9】

図 9



【図8】

図 8



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G043 CA03 DA06 EA01 EA02 FA05
HA02 HA03 HA05 HA09 HA15
JA02 JA03 KA03 KA09 LA02
LA03 MA01
2G057 AA04 BA10
2G059 BB04 DD13 EE07 FF06 GG01
HH03 JJ02 JJ03 JJ07 JJ13
JJ14 JJ17 JJ22 KK02 KK04
NN01